

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan ko.

Bioteknikka

2018

Iida-Maria Suominen

# PESULIUOSKONSENTRAATIN LAIMENNUSKERTOIMEN KASVATTAMINEN

Ida-Maria Suominen

## PESULIUOSKONSENTRAATIN LAIMENNUSKERTOIMEN KASVATTAMINEN

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kasvattaa 10x pesuliuoskonsentraatin laimennuskerronta 25x pesuliuoskonsentraatiksi. Syy muutokseen oli kasvava tarve pesuliukselle kuoppalevykaivojen pinnoituksen prosesseissa. Määrän kasvattamisen sijaan oli tehokkaampaa valmistaa pesuliuoskonsentraattia, jonka valmistusaika on sama, mutta saanto on liuotettuna 2,5-kertainen nykyiseen verrattuna. Opinnäytetyö suoritettiin Radiometer Turku Oy:n tuotantotiloissa.

Työn tarkoituksena oli osoittaa, että väkevämpi pesuliuoskonsentraatti on liukoinen ja tasalaatuinen. Ennen liuoksen valmistusta selvitettiin, että mitkä sekoituksen parametrit vaikuttavat, jotta sekoitus olisi mahdollisimman optimaalinen valmistettavalle pesuliuoskonsentraatille. Työssä tutkittiin myös pesuliuoskonsentraatissa käytettävien reagenssien liukoisuutta veteen, ja millä eri mittaamenetelmillä voidaan tutkia liuoksen homogeenisuutta. Työssä käytetyt materiaalit olivat Tris, NaCl, Tween 20 ja Germall II. Homogeenisuuden mittaamiseen käytettiin visuaalista sameustestiä ja refraktometriä. Homogeenisuustestissä näytteidenotto tapahtui ottamalla näytteitä liuoksen pinnalta, keskeltä ja pohjasta eri aikapisteistä. Näin voitiin tutkia sekoituksen tehokkuutta ja aineiden jakaantumista tasaisesti joka puolella liuosta.

Työn lopputuloksena saatiin asetettua oikeat parametrit pesuliuoskonsentraatin valmistukseen, kuten sekoitusaika ja -nopeus. Sekä osoitettiin, että sameustesti osoittautui paremmaksi mittaamenetelmäksi, ja että pesuliuoskonsentraatti on liukoinen ja tasalaatuinen. Laskuissa sattuneen virheen vuoksi 25x pesuliuoskonsentraatin sijasta oli valmistettu 22x pesuliuoskonsentraattia. Näin ollen työssä osoitettiin myös, että 25x pesuliuoskonsentraattia on mahdotonta valmistaa, koska liuos on liian kylläinen. Silti tapahtuneesta virheestä huolimatta saatiin osoitettua, että laimeampi 22x pesuliuoskonsentraatti on liukoinen ja homogeeninen. Parannusehdotuksena homogeenisuuden mittaamiseen olisi testata useampaa eri menetelmää parhaan mittaustuloksen saavuttamiseksi. 25x pesuliuoskonsentraatin liukenemattoman reagenssin selvittämiseen voisi myös tehdä oman testinsä.

### ASIASANAT:

Pesuliuoskonsentraatti, laimennuskerronin, homogeeninen, tasalaatuinen, liuosvalmistus

Iida-Maria Suominen

## RAISING DILUTION COEFFICIENT OF WASH CONCENTRATE

The aim of this Bachelor's Thesis was to raise the dilution coefficient of a 10x wash concentrate to 25x wash concentrate. The reason for this change was the increasing need for cleaning solution in the coating processes. Instead of growing the quantity of the 10x wash concentrate it was more efficient to prepare a wash concentrate with the same preparation time but 2.5 times the current yield. The study was carried out in the production premises of Radiometer Turku Oy.

The purpose was to show that a stronger wash concentrate is soluble and of uniform quality. Before preparing the solution it was clarified what parameters of the mixture have an effect so that the mixture would be optimal for the wash concentrate. The water solubility of the used reagents was also studied were the different measuring methods which can be used to study the homogeneity of the solution. The materials used were Tris, NaCl, Tween20 and Germall II. As methods for homogeneity measurement were, clarity test and refractometry were used. In the homogeneity test, samples were taken from the surface, the middle and the bottom of the solution vessel at separate time points. This way, mixing efficiency and the distribution of material evenly in the solution.

As a result the correct parameters for the making of the wash concentrate were set, such as mixture time and speed. It was also shown that the turbidity test was better measuring method than refractometry, and that the wash concentrate is soluble and of uniform quality. Because of a mistake in the calculation, 22x wash concentrate was prepared, instead of 25x wash concentrate. Therefore it was also shown that a 25x wash concentrate cannot be prepared because the solution is too saturated. Irrespective of the mistake it was shown that the 22x wash concentrate is soluble and homogenous. The improvement proposal for the measurement of homogeneity would be to test more separate methods for reaching the best measurement result. It could be own test to figure out insoluble reagents of the 25x wash concentrate.

### KEYWORDS:

Wash concentrate, dilution coefficient, homogenous, uniform quality, solution making

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 SEKOITUKSEN TEORIAA LYHYESTI</b>	<b>8</b>
2.1 Mekaaninen sekoitus	8
2.2 Sekoitinelimet	8
2.3 Sekoituksen tehokkuuteen vaikuttavat tekijät	12
<b>3 LIUKOKSEN KEMIAA</b>	<b>14</b>
3.1 Heterogeeninen tasapaino	14
3.2 Liukoisuustulo	14
3.3 Ionitulo	15
<b>4 KÄYTETTÄVIEN REAGENSSEN LIUKOISUUS</b>	<b>16</b>
4.1 Yleisesti liukoisuudesta	16
4.2 Reagenssien liukoisuus	17
<b>5 HOMOGEENISUUDEN MITTAUSMENETELMÄT</b>	<b>19</b>
5.1 Refraktometria	19
5.2 Polarimetria	20
5.3 Tiheysmittaus	21
5.4 pH-mittaus	21
5.5 Johtokyvyn mittaus	22
5.6 Spektrofotometrinen määrittäminen	23
5.7 Sameustesti	23
<b>6 OPTIMAALINEN SEKOITUS</b>	<b>24</b>
<b>7 NÄYTTEENOTTO</b>	<b>25</b>
<b>8 ANALYYSIMENETELMIEN LAADUNVARMISTUS</b>	<b>26</b>
8.1 Laboratorion laadunvarmistus	26
8.2 Menetelmien validointi	27
8.3 Prosessivalidointi	28
<b>9 LIUKOISUUDEN JA TASALAATUISUUDEN OSOITTAMINEN</b>	<b>30</b>

<b>10 TULOKSET JA TARKASTELU</b>	<b>33</b>
<b>11 LOPPUPÄÄTELMÄT</b>	<b>36</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>38</b>

## **KUVAT**

Kuva 1. Lapasekoitin (EKATO).	9
Kuva 2. Potkurisekoitin (Sunkaier).	10
Kuva 3. Turbiinisekoitin (Lightnin).	10
Kuva 4. Kiekkosekoitin (Vollrath).	11
Kuva 5 Optimaalinen sekoitus	24
Kuva 6 Laboratorion laadunvarmistus (Lehtonen;ym., 2004)	27

## **TAULUKOT**

Taulukko 1. Sameustestin tulokset. Sekoitusaika säätöpainoon lisäyksen jälkeen.	33
Taulukko 2. Refraktometrin tulokset. Sekoitusaika säätöpainoon lisäyksen jälkeen.	34
Taulukko 3. pH:n mittaustulokset lopputilavuudesta. Sekoitusaika lopputilavuuden jälkeen ennen näytteenottoa.	35

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tavoitteena oli kasvattaa 10-kertaisen pesuliuoskonsentraatin laimennuskerrointa 25-kertaiseksi. Syy tähän muutokseen oli kasvava tarve pesuliuokselle kuoppalevykaivojen pinnoituksen prosesseissa. Määrän kasvattamisen sijaan oli tehokkaampaa valmistaa pesuliuoskonsentraattia, jonka valmistusaika on sama, mutta saanto liuotettuna 2,5-kertainen nykyiseen verrattuna. Pesuliuoskonsentraatti laimennetaan yhdenkertaiseksi pesuliuokseksi, jota käytetään kuoppalevyn kaivojen pesemiseen ylimääräisestä kantaliuoksesta. Työn tarkoituksena oli osoittaa, että väkevämpi pesuliuoskonsentraatti on liukoinen ja tasalaatuinen.

Pesuliuoskonsentraatille asetettiin optimaalinen sekoitus, jossa valmistusastia ja sekoituslapa valittiin ihanteellisen sekoituksen takaamiseksi ja liuotettavan aineen liukoisuuden mukaan. Valmistusastiaksi valittiin geometrialtaan sellainen astia, jonka korkeus oli noin kaksi kertaa suurempi kuin halkaisija, ja johon lisättävä nesteen korkeus on yhtä suuri kuin säiliön halkaisija. Pitkät astiat tehostavat sekoitusta ja riittävä nestekorkeus takaa tasaisia virtauksia kaikkialla liuoksessa. Sekoituslapaksi valittiin lapasekoittaja, koska se soveltuu kiintoaineiden suspensointiin, ja sen halkaisija on noin kolmasosa astian halkaisijasta. Lapasekoittaja asetettiin astiaan kohtisuoraan pohjaa kohden etäisyydellä noin kolmasosa nesteenkorkeudesta.

Pesuliuoskonsentraatin homogeenisuutta testattiin kahdella eri menetelmällä, sameustestillä ja refraktometrialla, ottamalla näytteitä liuoksen pinnasta, keskeltä ja pohjasta eri aikapisteistä sekoituksen alkamisesta, kun kaikki reagenssit ovat liuenneet visuaalisesti liuokseen. Näytteet annosteltiin läpinäkyviin lasisiin noin neljän senttimetrin korkeisiin purkkeihin. Sameustestille ja refraktometrille otettiin omat näytteet. Sameustestissä näytteitä vertailtiin veteen ja referenssiliuoksiin I-IV tummaa taustaa vasten kirkkaassa valossa. Näyte on homogeeninen, jos se on yhtä läpinäkyvä kuin vesi tai kirkkaampi kuin referenssiliuos I. Näyte ei ole homogeeninen, jos se on sameampi kuin referenssiliuos I. Refraktometrissä näytteitä annosteltiin muutama pisara linssille, jonka jälkeen mikroskoopista katsomalla säädettiin näytön kuvaa selkeäksi ja luettiin näytteelle taitekertoimen suuruus ja Brix-arvo. Saaduista tuloksista saatiin osoitettua, että pesuliuoskonsentraatti on homogeeninen, ja saatiin myös ensimmäinen sekoitusaika reagenssien lisäyksen jälkeen.

Homogeenisuustestien jälkeen testattiin lopuksi pesuliuoskonsentraatin pH loppusekoituksen jälkeen. Pesuliuoskonsentraatin pH säädettiin ja lisättiin vettä loppupainoon. Tämän jälkeen aloitettiin sekoitus ja otettiin näytteitä eri aikapisteistä, jonka jälkeen näytteet laimennettiin vedellä ja sekoitettiin puolituntia. Sekoituksen jälkeen näytteistä mitattiin pH. Kaikkien näytteiden pH-arvot olivat rajoissa ja pesuliuoskonsentraatille saatiin loppusekoituksen kesto.

Työssä sattuneesta laskuvirheestä johtuen 25x pesuliuoskonsentraatin sijasta valmistettiin laimeampi pesuliuoskonsentraatti, joka osoitettiin olevan liukoinen ja tasalaatuinen. Samalla osoitettiin myös, että 25x pesuliuoskonsentraatti ei liukene.

Radiometer Turku Oy (ent. Innotrac Diagnostics Oy) on opinnäytetyön toimeksiantaja. Radiometer Turku Oy on diagnostiikka-alan yritys, joka valmistaa tuotteita sairauksien diagnosointiin. Tällä hetkellä Radiometer Turku Oy työllistää noin 150 työntekijää. Yritys on osana tanskalaista Radiometer -konsernia, jonka tehtävänä on auttaa terveydenalan työntekijöitä tekemään diagnostisia päätöksiä, jotka pelastavat potilaiden henkiä. Konsernin visio on kehittää maailmanlaajuisia terveydenhoitoa potilas diagnooseissa luotettavaksi, nopeaksi ja helpoksi.

## 2 SEKOITUKSEN TEORIAA LYHYESTI

Tässä luvussa kerrotaan lyhyesti mekaanisesta sekoituksesta ja sekoituksessa käytettävistä välineistä.

### 2.1 Mekaaninen sekoitus

Sekoitus on yksikköprosessi, jota käytetään erilaisten seosten valmistukseen. Tällaisia seoksia ovat esimerkiksi kiintoaineiden seokset, neste-nesteseokset (emulsiot) ja kiintoaine-nesteseokset (suspensiot). Sekoitus ei ole pelkästään seoksien valmistamista, vaan siihen liittyy myös kemiallisten, lämmön- ja aineensiirron prosessien yksikköprosessit. Sekoitusta käytetään siis reaktion ja lämmönsiirron nopeuttamiseksi. Nestetilassa tapahtuvassa sekoituksessa sekoitetaan nesteeseen toista nestettä, kiintoainetta tai kaasua. Sekoitus voi tapahtua joko pneumaattisesti tai mekaanisesti. Mekaanisessa sekoituksessa käytettävät sekoittimet voidaan jakaa aksiaalisiin ja radiaalisiin sekoittajiin. Aksiaalisissa sekoittimissa nesteen päävirtaus tapahtuu roottorin akselin suunnassa, kun taas radiaalisissa sekoittimissa päävirtaus tapahtuu roottorin säteen suunnassa. Mekaanista sekoitusta käytetään liuosten, nesteiden ja dispersioiden sekoitukseen. Sekoituksessa käytetään pyöriviä sekoitinlapoja, jotka aiheuttavat nesteeseen pyörteitä, suunnan ja nopeuden muutoksia. Sekoitusta voidaan tehostaa käyttämällä virtausesteitä tai useampaa roottoria. Kiintoaineen liukenemisnopeus johtuu sekoituksen voimakkuudesta, kiintoaineen ominaispinta-alasta, lämpötilasta sekä liuoksen ja pinnan välisestä konsentraatioerosta. (Karjalahti, 1987)

### 2.2 Sekoitinelimet

Sekoittimen tärkeimmät osat ovat sekoitinelin, käyttölaite, akseli ja tiiviste. Sekoituseli-mellä tarkoitetaan siis sekoitinta tai sekoitukseen kuuluvaa välinettä, jolla on vaikutusta sekoitukseen. Sekoitinelin valitaan sekoitusvaatimusten mukaan, jossa otetaan huomioon sekoituksen tavoitteet, sekoitettavien aineiden ominaisuudet, säiliön geometria ja aikaisemmat käyttökokemukset. Tyypillisimpiä sekoitinmalleja ovat erilaiset lapa-, turbiini- ja potkurisekoittimet. (Kankainen, 2014)



Lapasekoittimien lavat ovat suorakaiteen muotoisia, ja ne voivat olla kohtisuoraan tai vinosti akseliinsa nähden. Lapasekoittimessa lapoja voi olla useampi sekä eri korkeuksilla. Lapojen määrä vaihtelee kahdesta kuuteen ja kallistuskulma vaihtelee 30 asteesta 60 asteeseen. Kallistuskulmalla varustettua lapasekoitinta käytetään paljon sovellutuksissa, jotka vaativat korkean tehon, kuten kiintoaineen suspensointiin. (Kankainen, 2014) Alla olevassa kuvassa 1 on esimerkki lapasekoittimesta.



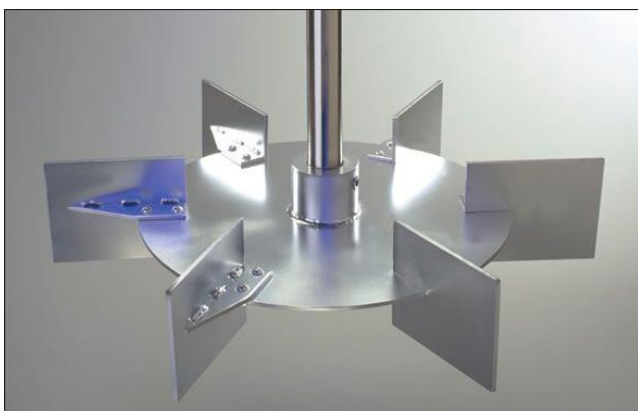
Kuva 1. Lapasekoitin (EKATO).

Potkurisekoittimissa on yksi tai useampi potkuri akselissa kiinni. Liuotuksessa käytetään potkurisekoitinta. Potkurisekoitin on nopeakäyntinen ja se muodostaa aksiaalisen virtauskuvion. Sitä käytetään tavallisesti matalaviskoosisille nesteille ja säiliöissä, joka on varustettu virtausesteillä. Potkurisekoitin soveltuu parhaiten homogenointiin ja suspensointiin. (Kankainen, 2014) Alla olevassa kuvassa 2 on esimerkki potkurisekoittimesta.



Kuva 2. Potkurisekoitin (Sunkaier).

Turbiinisekoitin on nopeakäyntinen ja aiheuttaa radiaalisen virtauksen. Turbiinisekoitin soveltuu sekoitettaessa pieniviskoosisia nesteitä säiliössä, jossa on virtausesteitä. Perinteisessä turbiinisekoittimessa on kuusi lapaa, jotka on asennettu 90 asteen kulmaan tukilevyyn nähden. Lavat voivat olla suoria tai kaarevia. Turbiini, jossa lavat on asetettu vuoroin ylä- ja alapuolelle tukilevyä, aiheuttaa erittäin suuria leikkausvoimia. Turbiinisekoittimia käytetään sovelluksissa, joissa vaaditaan suuria leikkausvoimia sekä turbulenssin muodostusta. (Kankainen, 2014) Alla olevassa kuvassa 3 on esimerkki turbiinisekoittimesta.



Kuva 3. Turbiinisekoitin (Lightnin).

Kiekkosekoitin on sahashampainen eli se koostuu ylös- ja alaspäin suunnatuista hampaista, jotka kiertävät lavan. Sillä saavutetaan suuria leikkausvoimia ilman staattoria tai virtausesteitä. Lapa saa aikaan pyörteen, joka vetää sisällön kohti terää. Kiintoaine hajotetaan mekaanisesti repimällä ja näin partikkelikoko pienentyy. (Kankainen, 2014) Alla olevassa kuvassa 4 on esimerkki kiekkosekoittimesta.



Kuva 4. Kiekkosekoitin (Vollrath).

Virtausesteet vähentävät tangentiaalista virtausta ja näin ollen myös pyörteen. Virtausesteiden koko, määrä, sijainti ja asento sekoitusastiassa vaihtelevat tilanteen mukaan. Virtausesteet lisäävät tehonkulutusta, mutta ne eivät vaikuta liukenemisnopeuteen. Mitä pienempi viskositeetti on, sitä parempi on käyttää virtausesteitä, jolloin myös virtausesteen leveys suurenee. Virtausesteiden käyttö on suositeltavampaa, kun kiintoaine on raskaampaa kuin neste. Virtausesteettömässä sekoittimessa muodostuu kierrosluvun kasvaessa akselin ympärille pyörre eli nesteen pinta laskee jyrkästi sekoitinta kohti. Mitä korkeampi kierrosnopeus on, sitä syvempi pyörre on. Tällöin on vaarana, että ilmaa pääsee imeytymään nesteeseen. Myöskään sekoitusta ei voida saada aikaiseksi, jos sekoitettava väliaine alkaa seurata liian kiinteästi sekoittimen liikettä. (Kankainen, 2014)

### 2.3 Sekoituksen tehokkuuteen vaikuttavat tekijät

Sekoituksen tehokkuus riippuu sekä sekoitettavista aineista että sekoitinlaitteen ominaisuuksista. Sekoituksen on oltava riittävän tehokas, jotta kaikki partikkelit ovat liikkeessä mahdollisimman tasaisesti. Viskositeetin suuruus vaikuttaa sekoitukseen. Suuri viskositeetti hidastaa virtausnopeuksia sekä rajoittaa virtauksien pääsyä sekoittimen läheisyyteen. Virtaus on suurimmillaan sekoituksen läheisyydessä ja pienenee siirtyessä kauemaksi potkurista. Näin ollen leikkausvoimat ovat erilaisia sekoitussäiliön eri osissa. Sekoitin asennetaan yleensä keskeisesti sekoitusastiaan, mutta se voidaan sijoittaa myös epäkeskeisesti tai vinoon suuntaan. Sekoittimen asento vaikuttaa virtauksien suuntaan. Sekoitin tulisi asentaa siten, että nestepinnan korkeus olisi yhtä suuri kuin säiliön halkaisija, sekoittimen halkaisija olisi  $1/3$  säiliön halkaisijasta ja sekoittimen etäisyys pohjasta olisi  $1/3$  nesteen pinnan korkeudesta. Virtausesteet tulisi mitoittaa säiliöön siten, että virtausesteiden leveys olisi noin  $1/10$  säiliön sisähalkaisijasta ja virtausesteiden etäisyys seinästä olisi noin  $1/50$  säiliön sisähalkaisijasta. Näin virtausesteiden taakse ei synny kuolleita kulmia. (Kankainen, 2014)

Ihanteellinen nestepinnan korkeuden ja säiliön halkaisijan suhde on 0,8. Jos suhdeluku on liian pieni, niin sekoitus ei ole tarpeeksi aksiaalinen eli pitkittäinen. Tämän vuoksi nestepinnan korkeus suhteessa säiliön halkaisijaan ei saa olla vähemmän kuin 0,6. Kun suhdeluku ylittyy 1,4, tarvitaan kaksi sekoitinta. Jos suhdeluku ylittää 2,0, on harkittava isompaa säiliötä. (Agitators, 2015)

Säiliön korkeuden suhde halkaisijaan on tyypillisesti välillä 2,0 ja 3,0, kuitenkin pidemmät säiliöt (enintään  $H_L/d_t$  4,0) vähentävät sekoituslapan vaativaa voimaa. Tankit, joiden pohja on kupera, tehostavat sekoitusta ja ehkäisevät katvealueita. (Agitators, 2015)

Sekoituslapan halkaisijan suhde säiliön halkaisijaan pitäisi olla välillä 0,3 ja 0,5. Jos sekoituslapa on liian pieni se ei muodosta tarpeeksi liikettä nesteeseen, kun taas liian iso sekoituslapa tarvitsee paljon enemmän energiaa ja on vähemmän tehokas. (Davis, Ryan Z., 2010)

Sekoittimen mittasuhteilla on merkitys sekoituksessa.  $D_1$  on sekoittajan halkaisija,  $L$  on roottorin etäisyys pohjasta,  $D_2$  on sekoitusastian halkaisija ja  $H$  on nestepinnan korkeus.

Potkuriroottoriselle sekoittimelle voidaan antaa seuraavat arvot:

$$D_1 = 0,5 \dots 0,2 D_2$$

$$L = 0,5 \dots 1,0 D_1$$

$$L = 0,1 \dots 0,5 D_2$$

$$H = 0,8 \dots 1,2 D_2. \text{ (Karjalahti, 1987)}$$

### 3 LIUKSEN KEMIAA

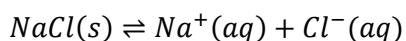
Opinnäytetyössä valmistettava pesuliuoskonsentraatti on heterogeeninen, koska siihen osallistuvat aineet ovat eri faaseissa; kiinteässä ja nestemäisessä faasissa.

#### 3.1 Heterogeeninen tasapaino

Heterogeenisessä tasapainossa liukeneva aine ja liuotin ovat eri faaseissa. Liuotin on yleensä nestettä. Kun kiinteä aine, kuten suola, liukenee nesteeseen, esimerkiksi veteen, syntyy reaktiotuotteiksi ioneja. Kiinteän aineen pitoisuutta kylläisessä liuoksessa kutsutaan aineen liukoisuudeksi. Liukoisuuteen vaikuttavat lämpötila, liuotin ja liuotettava aine. Kylläisessä liuoksessa olevien ionien ja liukenemattoman suolan välillä vallitsee dynaaminen tasapaino. Dynaaminen tasapaino tarkoittaa sitä, että liuoksessa tapahtuu reaktioita kumpaakin suuntaan samalla nopeudella, eli lähtöaineet tuottavat reaktiotuotteita ja reaktiotuotteet hajoavat lähtöaineiksi samaan aikaan. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

#### 3.2 Liukoisuustulo

Heterogeenisessä tasapainossa voidaan soveltaa massavaikutuksen lakia. Esimerkiksi alla on esitetty natriumkloridin liukeneminen:



Edellä olevalle reaktioyhtälölle voidaan kirjoittaa tasapainovakion lauseke massavaikutuksen lain mukaan:

$$K = \frac{[Na^+] \cdot [Cl^-]}{[NaCl]}$$

Liuenneen aineen konsentraatio ei riipu kiinteän aineen määrästä, jolloin voidaan määritellä liukoisuustulo eli  $K_s$ .

$$K_s = [Na^+][Cl^-]$$

Liukoisuustulo on kylläisessä liuoksessa olevien liuenneen aineen ionien konsentraatioiden tulo. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

### 3.3 Ionitulo

Kun kyseessä on kylläinen liuos, jossa vallitsee dynaaminen tasapaino, käytetään liukoisuustuloa. Ionituloa taas voidaan käyttää kaikille suolan vesiliuoksille.

$$Q = [A^{m+}]^a [B^{n-}]^b$$

Edellä olevassa kaavassa Q on ionitulo. Kun ionien konsentraatiot tunnetaan, voidaan niiden avulla laskea tutkittavan liuoksen ionitulo ja verrata se kyseisen suolan liukoisuustulon  $K_s$ -arvoon. Jos ionitulo Q on pienempi kuin liukoisuustulo  $K_s$  niin liuos on alikylläinen. Tämä tarkoittaa sitä, että ainetta voidaan liuottaa lisää aina  $K_s$ :n ilmoittamaan arvoon asti. Jos ionitulo on yhtä suuri kuin liukoisuustulo, liuos on ylikylläinen. Tällöin tapahtuu saostumista, kunnes ionitulo on sama kuin liukoisuustulo. Jos taas ionitulo on suurempi kuin liukoisuustulo, niin liuos on kylläinen. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

## 4 KÄYTETTÄVIEN REAGENSSEN LIUKOISUUS

Tässä luvussa käydään läpi yleisesti liukoisuudesta ja miten liuoksessa käytettävät aineet vaikuttavat liukoisuuteen.

### 4.1 Yleisesti liukoisuudesta

Poolinen aine liukenee toisen pooliseen aineeseen ja pooliton aine liukenee poolittomaan aineeseen. Toisin sanoen samanlainen liuottaa samanlaista. Kun poolinen ja pooliton aine sekoitetaan keskenään, muodostuu kaksi faasia, jotka eivät sekoitu keskenään. Liukoisuuteen vaikuttavat useat tekijät, joista tärkein mainittiin jo alussa. Esimerkiksi suolojen liukoisuus, kuten natriumkloridi, on voimakkaasti riippuvainen lämpötilasta. Ionien liike kasvaa samalla kun liuoksen konsentraatio kasvaa. Tällöin ionit törmäilevät toisiinsa ja alkavat saostua. Kun kaikki kiinteä aine on liennut liuokseen, on liuos silloin homogeeninen eli kaikki aineet ovat samassa faasissa. Myös lämpötilaa nostamalla voidaan lisätä liukoisuutta. (Kalsi, 2015) Tässä työssä valmistetussa pesuliuoskonsentraatissa käytettävät reagenssit ovat Tris, NaCl, Germall II ja Tween 20.



## 4.2 Reagenssien liukoisuus

Tris eli Tris-(hydroksimetyyli)-aminometaani on orgaaninen yhdiste, jota käytetään yleisesti kemiallisessa tuotannossa puskuriliuksena tai lääkeaineena. Tris:n kemiallinen kaava on  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ , ja sen molekyylipaino on 121,14 g/mol. Tris on koostumukseltaan kiinteä, valkoinen ja hajuton aine, jonka vesiliukoisuus on 800 g/l lämpötilassa 20 °C. (Merck, 2015)

Tris on erittäin liukoinen aine, joka helposti ylikyllästyy; lisäksi sen liukoisuus on vahvasti lämpötilaherkkä. Tris ei myöskään saosta kalsiumsuoloja, ja se on liuksessa stabiili jopa kuukausia. (Paul Schindler, 1967)

Tris-puskureita käytetään biokemiassa kontrolloimaan pH:ta fysiologisissa rajoissa, eli pH 7-8. Tämä sen vuoksi, koska fosfaatit aiheuttavat ei-toivottuja sivureaktioita biologisissa aineissa. (Leonard, 2015)

Tris:n pH nousee keskimäärin 0,1 pH-yksikköä kymmenkertaista laimennusta kohden. pH voi muuttua dramaattisesti, jos liuosta laimennetaan ja liuksessa on Tris:n optimaalisen puskuroinnin arvoalueen rajat. (Optimaalinen puskurointiraja pH 7,3-9,3). Lämpötilan muutos vaikuttaa laajasti Tris:n dissosiaatioon. Esimerkiksi jos valmistetaan Tris-puskuria, jonka pH on 7 asteessa 4 °C, niin saman puskurin pH on laskenut 5,95 asteessa 37 °C. (Leonard, 2015)

NaCl eli natriumkloridi on ruokasuola, joka on huoneenlämmössä kiinteä ja haihtumaton aine. Vahvan ionisidoksen vuoksi natriumkloridin sulamispiste on korkea. Suolan tavoin natriumkloridi liukenee veteen hyvin, muodostaen ioni-dipoli-sidoksia, jotka ovat vetysidoksia vahvempia. Maksimi liukenevuus veteen 20 °C asteessa on 358 g/l. Natriumkloridin liukenevuus kasvaa, kun liuokseen lisätään suolahappoa. (Merck, 2009)

Germall II, toiselta nimeltään diazolidinyli urea, on vesiliukoinen jauhemainen aine, jota käytetään usein kosmetiikassa ja henkilökohtaisissa hoitotuotteissa. Kemiallinen kaava on muotoa  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_7$ . Germall II saattaa vapauttaa formaldehydiä ja ristireaktioita muiden formaldehydin vapauttajien kanssa. Germall II:n liukoisuus veteen on 50 mg/ml. (Contact Dermatitis Institute, 2018)

Tween 20 on ioniton detergentti, jota käytetään biokemiallisissa sovelluksissa. Kemiallinen kaava on  $C_{26}H_{50}O_{10}$ . Ulkonäöltään Tween 20 on kirkas, keltainen/ kellanvihreä viskoottinen aine. Tween 20:ä käytetään emulgoivana aineena stabiileissa öljy-vesi emulsioiden valmistuksessa. Tween 20 sekoittuvuus veteen on 1000 mg/ml. Tween 20:n liukenee myös alkoholiin, etyyliasetaattiin, metanoliin ja liukenemattomiin mineraaliöljyihin. (Sigma-Aldrich, ei pvm)

## 5 HOMOGEEENISUUDEN MITTAUSMENETELMÄT

Tässä opinnäytetyössä valmistetun pesuliuoskonsentraatin kokonaistilavuus on suuri, mikä tarkoittaa myös sitä, että liuokseen lisättävien reagenssien määrä kasvaa. Tämän vuoksi on tarkasteltava sekoituksen aikana tietyissä aikapisteissä aineiden liukenemista veteen. Visuaalisella tarkastelulla nähdään, kun kaikki reagenssit ovat lienneet liuokseen, mutta tarkempaa tarkastelua varten tarvitaan eri menetelmiä, joilla voidaan todeta, että liuos on tasalaatuista, eli kaikki aineet ovat jakautuneet tasaisesti kaikkialla liuoksessa. Seuraavaksi on luokiteltu eri menetelmiä, joilla voidaan tutkia liuoksen tasalaatuisuutta.

### 5.1 Refraktometria

Refraktometria perustuu aineen taitekertoimen mittaamiseen määritettäessä aineen pitoisuutta. Taitekertoimen mittaaminen tehdään yleensä tarkastelemalla valon käyttäytymistä mittausrisman ja mitattavan aineen rajapinnassa. Tähän käytettävää laitetta kutsutaan refraktometriksi. (Mäntyvaara, 2011)

Mitattavan nesteen ainepitoisuus määritetään mittaamalla valon etenemisnopeutta nesteessä. Valon etenemisnopeuden avulla voidaan ilmoittaa taitekerroin  $n$ , joka on

$$n = \frac{c}{v}$$

, jossa  $c$  on valon etenemisnopeus tyhjiössä ja  $v$  on valon etenemisnopeus nesteessä. (Mäntyvaara, 2011)

Valon kulkiessa väliaineesta toiseen, väliaineiden rajapinnalla voi tapahtua taittumista sekä heijastumista. Valonsäteen osuessa kahden väliaineen rajapintaan osa tulevasta valonsäteestä heijastuu ja osa taittuu. Väliaineiden taitekertoimet merkitään tunnuksilla  $n_1$  ja  $n_2$ . Tuleva, heijastuva ja taittuva säde muodostavat kulmia rajapinnan normaaliin nähden. Nämä kulmat ovat vastaavasti  $\theta_i$ ,  $\theta_r$  ja  $\theta_t$ . Kulmien väliset suhteet voidaan esittää Snellin lain mukaan seuraavasti

$$\frac{\sin \theta_i}{\sin \theta_t} = \frac{n_2}{n_1}$$

Valon taitekertoimeen vaikuttaa nesteeseen liuenneiden aineiden pitoisuus. Taitekerroin saadaan, kun mitataan valon kokonaisheijastuksen rajakulma refraktometrin prisman ja nesteen rajapinnassa. Kokonaisheijastuksen rajakulma saadaan Snellin lain mukaisesti:

$$\sin \theta_c = \frac{n_n}{n_p}$$

, jossa  $n_n$  on tutkittavan nesteen taitekerroin, ja  $n_p$  on prismamateriaalin taitekerroin. Jos tuleva säde saapuu rajakulmaa loivemmassa kulmassa ( $\theta_i > \theta_c$ ), niin edellisellä yhtälöllä ei ole reaalisia ratkaisuja, jolloin valo ei pääse rajapinnan läpi. Kyseessä on silloin kokonaisheijastuminen, jossa kaikki rajapinnalle tuleva valo heijastuu. Kun prismamateriaalin taitekerroin tunnetaan, rajakulmasta voidaan laskea mitattavan aineen taitekerroin, jos se on alempi kuin prismamateriaalin taitekerroin ( $n_p > n_n$ ). (Mäntyvaara, 2011)

## 5.2 Polarimetria

Polarimetria on mittausmenetelmä, jossa polarisoidun valon annetaan kulkea polarimetrimittauskyvetissä olevan tutkittavan aineen liuoksen läpi, josta voidaan havaita mahdollinen polarisaatiotason kiertokulma. Tämän havaitun kiertokulman suuruus,  $\alpha$ , on suoraan verrannollinen kyvetin pituuteen eli siihen matkaan, minkä valo kulkee optisesti aktiivisen aineen liuoksessa. Kiertymän suuruuteen vaikuttaa myös liuoksen väkevyys. Verrannollisuuskertoimenä on kyseisen aineen ominaiskierto,  $[\alpha]$ .

$$\alpha = [\alpha] l \gamma$$

, jossa  $\alpha$  on havaittu kiertokulma,  $l$  valon liuoksessa kulkema matka (eli kyvetin pituus) ja  $\gamma$  optisesti aktiivisen aineen massakonsentraatio. Täten ominaiskierron yksikkö on  $\text{dm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{cm}^3$ .  $\alpha$ :n arvo riippuu myös mittauslämpötilasta ja käytetyn valon aallonpituudesta, jotka on ilmaistava  $[\alpha]$ :n arvoja raportoitaessa, siten että lämpötila on yläindeksi ja aallonpituus alaindeksi. (Korhonen & Vesterinen, 2016)

### 5.3 Tiheysmittaus

Tiheyttä voidaan mitata tiheysmittarin avulla. Tiheysmittari on instrumentti, jolla määritetään aineen ominaispaino. Laitteen periaate perustuu Arkhimedeen lakiin, jossa kiinteä aine syrjäyttää oman painonsa verran vettä. Tiheysmittarit voidaan jakaa kahteen pääluokkaan: vettä painavammät nesteet ja vettä kevyemmät nesteet. Standardi tiheysmittari luokka tunnetaan toisella nimellä ominaispainoasteikkona, jossa tislattu vesi on yhtä suuri kuin 1,000. Tämä on myös alkuperäinen mittauspiste. Vettä kevyemmät liuokset ovat mitattu alle 1,000 ominaispainon, ja vettä painavammät liuokset ovat mitattu yli 1,000 ominaispainon. (Grainger, 2016)

Tiheysmittari on valmistettu ohuesta lasista tai muovisesta putkesta, jonka molemmat päät on sinetöity umpeen asteittaisella tai printatulla asteikolla, joka on kalibroitu ominaispainolla. Toinen päistä on sipulin muotoinen ja painotettu joko hienon lyijykuulan tai teräskuulan kuristimella. Kuristin aiheuttaa instrumentin kellumisen pystysuorassa liuoksessa. Toinen pää on lasia tai muovinen sylinteri, joka tunnetaan tiheysmittari tölkinä. Tämä pää on täytetty mitattavalla liuoksella. (Grainger, 2016)

Tiheysmittari asetetaan tiheysmittarin tölkkiin, joka sisältää näyteliuosta. Näyteliuoksen ominaispaino on osoitettu, kun näyte liuoksentaso tölkissä on asettunut tiheysmittarin asteikon pisteeseen. Riippumatta siitä mitä asteikkoa käytetään, vettä painavimpien ja kevyempien näyteliuoksien painot voidaan dokumentoida. (Grainger, 2016)

### 5.4 pH-mittaus

pH-mittarin toiminta perustuu potentiometriaan, jonka periaate on mittauslaitteiston elektrodien ja näytteen välisen jännitteen mittaaminen. Mittauslaitteisto sisältää ioniselektiivisen elektrodin ja vertailuelektrodin muodostaman sähköparin. Jännite kertoo halutun ionipitoisuuden, koska vertailuelektrodin potentiaali pysyy vakiona, eikä siten häiritse ioniselektiivisen elektrodin toimintaa, jonka potentiaaliin vaikuttaa mitattavan ionilajin pitoisuus. (Eskeli, et al., ei pvm)

### 5.5 Johtokyvyn mittaaminen

Johtokykyymittauksessa mitataan liuoksen sähkönjohtavuutta, joka saadaan mittaamalla sen vastus eli resistanssi  $R$  tai johtokyky eli konduktanssi  $G$ . Johtokyky on vastuksen käänteisarvo eli

$$G = 1/R$$

Liuoksen sähkönjohtavuus eli ominaisjohtokyky  $\gamma$  voidaan laskea mitatusta vastuksesta tai johtokyvystä:

$$\gamma = k \cdot 1/R$$

tai

$$\gamma = k \cdot G$$

jossa  $k$  on elektrodikennon kenno- eli astiavakio. (Jaakkola, 2009)

Johtokykyyn vaikuttaa lämpötila. Lämpötilan kasvaessa ionien johtokyky kasvaa, jolloin johtokyvyn kasvu on riippumaton liuoksen konsentraatiosta. Lämpötilan kasvu vaikuttaa vähiten vahvojen emästen ja happojen ja muiden vahvojen elektrolyyttien johtokyvyn kasvuun, mutta kasvattaa heikkojen elektrolyyttien johtokykyä. Tämän vuoksi lämpötila on pidettävä vakiona, jotta mittauksissa lämpötilan aiheuttama virhe olisi mahdollisimman pieni. (Jaakkola, 2009)

Konsentraation kasvu parantaa liuoksen sähkönjohtavuutta, koska ionien väliset vetovoimat kasvavat, jolloin sähkönjohtavuus kasvaa. (Jaakkola, 2009)

Liuoksen viskositeetti vaikuttaa myös johtokykyyn. Viskositeetin kasvaessa johtokyky pienenee. Vähäinen dissosioituminen pienentää myös elektrolyyttiliuoksen johtokykyä. (Jaakkola, 2009)

## 5.6 Spektrofotometrinen määrittäminen

Spektrofotometria on tekniikka, jossa valon lähteenä käytetään monokromaattista valoa, eli yhtä aallonpituutta, ja detektorina valokennoa. Spektrofotometriassa voidaan mitata joko transmittanssia tai absorbanssia. Transmittanssi on näytteen läpäisseen valon intensiteetin suhde näytteeseen tulevan valon intensiteettiin. (Korhonen & Vesterinen, 2016)

$$T = \frac{I}{I_0}$$

, jossa  $T$  on transmittanssi,  $I$  läpäisevän valon intensiteetti ja  $I_0$  tulevan valon intensiteetti. Transmittanssi ilmoitetaan tavallisesti prosentteina ( $100 T \%$ ) ja se saa arvoja nollan ja yhden väliltä. Absorbanssi on transmittanssin kymmenlogaritmin vastaluku:

$$A = -\lg T$$

Absorbanssi on käytännön mittauksissa käyttökelpoisempi, koska on osoitettu, että laimeiden liuosten absorptio noudattaa Lambertin ja Beerin lakia:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

, jossa liuoksen absorbanssi,  $A$ , on suoraan verrannollinen liuenneen aineen konsentraatioon,  $c$ .  $l$  on liuoksen kerrospaksuus ja  $\varepsilon$  on molaarinen absorptiokerroin.

(Korhonen & Vesterinen, 2016)

## 5.7 Sameustesti

Sameustesti perustuu visuaaliseen tarkasteluun, jossa näytteen kirkkautta vertaillaan referenssiliuokseen I-IV ja veteen mustaa/tummaa taustaa vasten ja mahdollisimman kirkkaassa valossa. Referenssiliuokset valmistetaan ohjeen mukaan standardiliuoksesta ja vedestä eri laimennuksilla. (Terho, ei pvm)

Määritettävää liuosta verrataan 5 minuuttia referenssien valmistuksen jälkeen kirkkaassa valossa mustaa taustaa vasten. Liuoksia vertaillaessa astioiden tulee olla vertikaalisesti taustaa vasten. Valon tulee olla sellainen, että Ref I erottuu selvästi vedestä, ja Ref II erottuu Ref I:stä. Määritettävä liuos on kirkas, jos sen sameus on sama kuin vedellä tai sen sameus ei ylitä Ref I näytteen sameutta. (Terho, ei pvm)

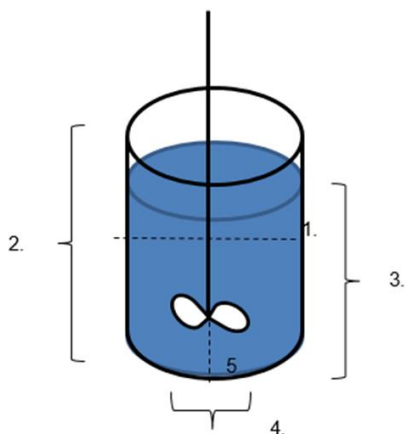
## 6 OPTIMAALINEN SEKOITUS

Työssä valmistettu pesuliuoskonsentraatti tehtiin 200 litran astiaan, jonka mitat on kerrottu alla olevassa kuvassa 5. Valmistettavan erän koko on 100 litraa. Sekoituksen tehokkuuteen vaikuttavat tekijät (kts. 2.3.) on huomioitu tässä työssä siten, että sekoitusastian mitat ovat suhteessa toisiinsa optimaaliset. Tarkoituksena on löytää optimaalinen sekoitus, jolla taataan onnistunut aineiden sekoitus. Tässä opinnäytetyössä sekoituslapaksi on valittu lapasekoittaja, joka sopii hyvin kiintoaineen sekoittamiseen veteen ja jonka halkaisija on sopivan kokoinen alla annetuille mitoille. Lapasekoittaja on asetettu pesuliuosastiaan kohtisuoraan astian pohjaa kohti. Käytettävän pesuliuosastian mitat ovat seuraavat:

1. halkaisijan sisämitta: 54,2 cm
2. korkeus (sisä): 100 cm

Näitä tietoja hyödyntäen optimaalinen sekoitus tälle liuosastialle on:

3. nesteenpinnan korkeus: 43,36cm ( $\cong$  43,4 cm)
4. sekoittimen halkaisija: 18,07cm ( $\cong$  18,1 cm)
5. sekoittimen etäisyys pohjasta: 14,45cm ( $\cong$  14,5 cm)



Kuva 5 Optimaalinen sekoitus

Laskukaavat edellisille arvoille: Nesteenpinnan korkeus =  $0,8 \cdot$  säiliön halkaisija. Sekoittimen halkaisija = säiliön halkaisija / 3. Sekoittimen etäisyys pohjasta = nesteenpinnan korkeus / 3.



## 7 NÄYTTEENOTTO

Tässä opinnäytetyössä näytteenotto tapahtuu sekoituksen eri aikapisteissä siten, että jokaisessa aikapisteessä otetaan näytteitä liuoksen pinnalta, keskeltä ja pohjasta. Nämä näytteet annostellaan lasipurkkeihin, joista otetaan testattava näyte homogeenisuuden mittaamiseksi refraktometrillä ja sameustestillä. Alla on kerrottu lyhyesti näytteenoton teoriaa.

Näytteenotto on tärkeä vaihe analyysitulosten luotettavuuden kannalta, koska näytteenotossa tehty virhe antaa väärän analyysituloksen. Ennen näytteenottoa on tehtävä näytteenottosuunnitelma, jossa on huomioitava kaikki mahdolliset puutteet, otettava näyte, otoskoko ja näytteiden lukumäärä. Otettavasta näytteestä tutkitaan kohteena olevan joukon, yksikköryhmän tai valmistusprosessin ominaisuuksia. Näyte voi olla näyteyksikkö, osanäyte, kokoomanäyte, alanäyte, laboratorionäyte tai testinäyte. Näyteyksikkö on hyödykemäärän edustava osa. Osanäyte tarkoittaa tavaraerästä otettua näytettä, joka on otettu yhdellä kerralla ja määrätyllä tavalla. Kokoomanäyte on koottu näyte kahdesta tai useammasta osanäytteestä. Alanäyte saadaan osittamalla homogenoitu kokoomanäyte. Laboratorionäyte on tarkoitettu tarkastettavaksi tai testattavaksi laboratorioon, ja testinäyte on testiin tarkoitettu. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

Näytteenottosuunnitelmassa kuvataan toimenpideketju, joka takaa edustavan näytteen. Näytteenottosuunnitelmassa selvitetään myös näytteiden käsittely, varastointi ja näytteenottotapahtuma. Tutkimuksen tarkoitus, tutkittavien yhdisteiden ominaisuudet, näytteenottokohteen ominaisuudet, analysoitavasta ominaisuudesta haluttavat tiedot, käytetty analyysimenetelmä ja taloudelliset resurssit vaikuttavat menetelmään, jolla näytteet otetaan. Näytteenottosuunnitelma sisällytetään tutkimussuunnitelmaan, josta ilmenee tutkimusmenetelmät, mitattavat parametrit, näytteenottopaikat ja -tiheys. Näytteenotossa tapahtuvat mahdolliset virheet ovat muun muassa väärän tai epäedustavan näytetapaikan valinta, virheellinen näytteenottotapa, näytteen likaantuminen ja väärä näytteen jatkokäsittely. Näytteen kontaminoituminen saattaa tapahtua näytteenoton ja säilytyksen aikana. Kuljetus- ja säilytysaika aiheuttavat virheen analyysitulokseen, jos tutkittava aine hajoaa näytteessä. Näytteen säilyvyyttä voi pidentää kylmässä, esimerkiksi jääkaapissa tai pakastimessa. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

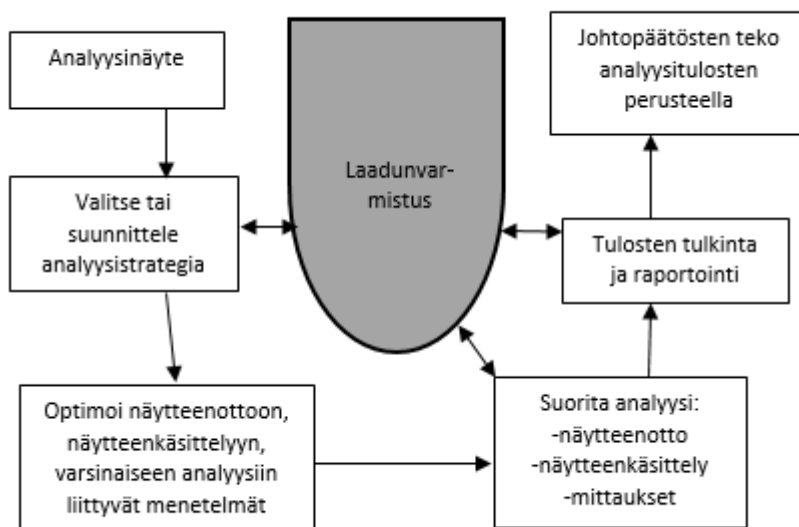
## 8 ANALYYSIMENETELMIEN LAADUNVARMISTUS

Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan validointia, etenkin prosessivalidointia, osana teoriaa, koska ajanpuutteen vuoksi käytännön osuudessa ei päästy validointiin asti.

Laboratorion mittausjärjestelmään kuuluu tutkittava näyte, käytettävä analyysimenetelmä, käytettävä mittalaite, mittaja ja ympäristö, jossa mittaus suoritetaan. Jotta voidaan varmistaa tulosten laatu, on kaikkia näitä osatekijöitä seurattava laatujärjestelmien mukaan. MIKES ylläpitää ja kehittää kansallista mittanormaalijärjestelmää ja vastaa SI-yksikköjärjestelmän toteuttamista, ja ISO 9000 -laatujärjestelmästandardi, jonka vaatimuksia noudattavat yleensä teollisuuden ja tuotantolaitosten laatujärjestelmät. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

### 8.1 Laboratorion laadunvarmistus

Laboratorion laatujärjestelmän piiriin kuuluu laboratorion henkilökunta, laitteistot, menetelmät, kemikaalit, dokumentit ja muut vastaavat asiakirjat. Tämän laatujärjestelmän toimivuutta tarkastellaan sisäisillä ja ulkoisilla auditoinneilla. Laatukäsikirja toimii pohjana, ja siinä on esitetty laboratorion laatutoiminnan käytännöllinen toteutus menettelytapoina, joita on muun muassa analyysimenetelmien suorituksesta, huollosta ja ylläpidosta. (Lehtonen & Sihvonen, 2004) Alla olevassa kuvassa 6 on kuvattu laboratorion laadunvarmistus.



Kuva 6 Laboratorion laadunvarmistus (Lehtonen;ym., 2004)

## 8.2 Menetelmien validointi

Validointi tarkoittaa validoitavan kohteen tarkastamista luotettavilla menetelmillä. Validoinnissa validoitava kohde osoitetaan toimivan ennalta määriteltujen kriteerien mukaisesti. Toisin sanoen validoinnilla osoitetaan, että validoitava kohde toimii tasaisesti ja toistettavasti.

Validoinnilla on suora yhteys menetelmällä saatavien tulosten laatuun. Validoinnissa saatujen tulosten avulla osoitetaan, että menetelmä toimii hyväksyttävästi. Validointisuunnitelmassa on huomioitava validoinnin laajuus, validoinnin kohteena olevan menetelmä, validoitavat parametrit, asiakkaan tarpeet ja vaatimukset sekä näytematriisi. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

Menetelmän spesifisyyteen liittyvät vaatimukset validoinnissa ovat, että menetelmällä pystytään määrittämään analyytti riittävän tarkasti silloinkin, kun kaikki näytteeseen liittyvät komponentit ovat läsnä. Spesifisyyteen ei aina päästä, joten on tyydyttävä selektiivisyyteen, joka määritetään vertaamalla puhtaan analyytin ja lisätyn analyytin vastetta tyypillisessä näytematriisissa. Jos selektiivisyys ei riitä on menetelmää korjattava. Tällöin

validoinnissa selvitetään ja dokumentoidaan häiriöiden aiheuttajat ja niiden vaikutus. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

Validoinnissa lineaarisuuden kriteerinä on, että menetelmä on lineaarinen tietyllä mittausalueella. Tällä tietyllä mittausalueella on sijaittava vertailu- ja raja-arvo. Lineaarisuutta voidaan arvioida kuvaajasta joko silmämääräisesti, sovittamalla mittausaineistoon erilaisia funktioita ja vertaamalla  $R^2$ -arvoja. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

Menetelmän tarkkuutta voidaan validoida vertaamalla menetelmällä saatuja tuloksia toisella tarkaksi tunnetulla menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tarkkuuden kriteeriksi voidaan asettaa sallittava erotus oikean ja mittauksessa saadun arvon välillä. Validoidessa menetelmän toistotarkkuutta tehdään samalle näytteelle perättäisiä määrittäisiä tai rinnakkaismäärittäisiä. Tarkkuuden arvioinnissa lasketaan saaduista tuloksista hajonta tai suhteellinen hajonta. Menetelmän mittausalue käsittää pitoisuusalueen, jolla menetelmän validointiparametrit eli lineaarisuus, tarkkuus ja toistotarkkuus ovat hyväksyttävällä tasolla. Toteamisraja kertoo menetelmän sen pitoisuuden ja ainemäärän, joka tuottaa selvästi havaittavan signaalin. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

Menetelmän stabiilisuuden kannalta kriittisiä kohtia ovat reagenssien, standardien ja liuosten säilyvyys. Stabiilisuus selvitetään toistamalla määrittystä yhä uudestaan ja käyttämällä siinä samoja standardeja, liuoksia ja näytteitä, kunnes vasteessa havaitaan selvä muutos, joka voi olla esimerkiksi 20%:n muutos määrittäisrajapitoisuudessa. Aikavaatimus voi olla yksi menetelmän stabiilisuuden mitta, esimerkiksi liuoksen käyttöaika. Häiriönsietokyvyn vaatimukset selvitetään tekemällä pieniä muutoksia esimerkiksi lämpötilassa, liuoksen koostumuksessa tai sekoitusajoissa. Muutokset on tehtävä vain yksi asia kerrallaan, jotta voidaan havaita muutoksen vaikutus. (Lehtonen & Sihvonen, 2004)

### 8.3 Prosessivalidointi

Prosessivalidoinnin peruseriaatteisiin kuuluu, että tuotteen suunnittelussa tai valmistuksessa on huomioitu laatu, turvallisuus ja tehokkuus. Laatu ei voida riittäväällä tavalla varmistaa vain prosessin ja valmiin tuotteen tarkastelulla ja testauksella. Jokainen valmistusprosessin vaihe on ohjattu sen varmistamiseksi, että valmis tuote täyttää kaikki laatuominaisuudet, mukaan lukien spesifikaatiot. (FDA, 2011)

Prosessivalidointi on tiedon keräämistä ja arviointia, aina prosessin suunnittelusta valmiiseen tuotteeseen, joka muodostaa todisteen siitä, että prosessi pystyy tuottamaan jatkuvasti laadukkaita tuotteita. Prosessivalidointi sisältää useita toimintoja, jotka tapahtuvat tuotteen ja prosessin elinkaaren aikana. Prosessin validointitoimintaa voidaan kuvailla kolmella eri vaiheella. (FDA, 2011)

Ensimmäinen vaihe on prosessin suunnittelu, jossa valmistusprosessin määrittäminen perustuu kehitystyöhön ja laajentumiseen liittyviin toimiin. Toinen vaihe on prosessivalidointivaihe eli PQ, jossa arvioidaan, onko prosessi kykenevä tuottamaan toistettavissa olevaa kaupallista valmistusta. Kolmas vaihe on jatkuvan prosessin todentaminen, jossa prosessin jatkuva toimiminen varmistetaan rutiininomaisesti. (FDA, 2011)

## 9 LIUKOISUUDEN JA TASALAATUISUUDEN OSOITTAMINEN

Ennen validointeja pesuliuoskonsentraatille määritetään käytettävät sekoitusajat sekä testataan valmistettavan liuoksen homogeenisuutta eli tasalaatuisuutta. Testissä osoitetaan myös, voidaanko liuoksen pH säätää lisäämällä vakiomäärä 1 M HCl-liuosta suurempaan tilavuuteen, kuten edellisessä testissä oli osoitettu.

Ennen testiä laadittiin kirjallinen suunnitelma, jossa on esitetty testin tarkoitus ja käytettävät menetelmät. Valmistettavan liuoksen homogeenisuutta mitataan kahdella eri visuaalisella menetelmällä: sameustestillä ja refraktometrialla. Suunnitelmaan kuuluu myös tarpeelliset ohjeet ja materiaalilista. Pesuliuoskonsentraatin valmistusohjeeseen on myös lisätty optimaalisen sekoituksen parametrit. Tarkoituksena on asettaa sekoitus sellaiseksi, että liuoksessa olevat reagenssit sekoittuvat tasaisesti kaikkialle liuoksessa.

Ennen sameustestiä valmistettiin siihen tarvittavat liuokset. Syynä tähän oli primäärinen sameusliuos, joka vaatii seisotusajaksi vähintään 24 tuntia. Loput sameustestin liuokset tehtiin testipäivänä.

Pesuliuoskonsentraatin valmistuksessa vettä lisättiin ensin noin puolet pH:n säätöpainosta. Tarvittavat reagenssit lisättiin ohjeiden mukaisessa järjestyksessä veteen sekoituksen ollessa päällä (100 rpm). Kun kaikki reagenssit oli lisätty, lisättiin vettä pH:n säätöpainoon. Tämän jälkeen aineiden liukenemista seurattiin visuaalisesti. Näytteidenotto tapahtui, kun kaikki liuokseen lisätyt reagenssit olivat lienneet. Näytteitä otettiin liuoksen pinnalta, keskeltä ja pohjasta lasisiin tasapohjaisiin lasipurkkeihin, joiden korkeus on noin 4 cm. Näytteidenotto tapahtui puolen tunnin välein, jotta saatiin määritettyä sopiva sekoitusaika, jossa kaikki aineet ovat sekoittuneet tasaisesti liuoksessa.

Ensin näytteitä tutkittiin sameustestillä, jossa näytteitä verrattiin kirkkaassa valossa tummaa taustaa vasten veteen ja referenssiliuoksiin I-IV. Näyte on kirkas (eli liennut), jos sen sameus on yhtä kirkas kuin vedellä tai sen sameus ei ylitä referenssi I sameutta. Tuloksiin kirjattiin näytteen sameusaste. Seuraavaksi näytteitä tarkasteltiin refraktometrin avulla, joka oli lainassa Turun ammattikorkeakoululta. Refraktometri säädettiin ensin vedellä mittaamaan oikeaa aluetta, jonka jälkeen linssi pyyhittiin kevyesti nukkaamattomalla paperilla. Näytteet tutkittiin yksi kerrallaan siten, että näytettä pipetoitiin muutama

pisara linssille, jonka jälkeen linssi suljettiin ja mittausalue säädettiin oikealle alueelle mikroskoopin avulla. Tuloksiin kirjattiin näytteiden Brix-arvo, taitekerroin ja lämpötila.

Testien jälkeen jatkettiin pesuliuoskonsentraatin valmistusta. 1 M suolahapon määrä laskettiin lopputilavuuden mukaan ja se lisättiin suoraan liuokseen, jonka jälkeen vettä lisättiin loppupainoon asti. Seuraavaksi määritettiin liuokselle sekoitusaika, jonka jälkeen liuoksen pH on rajoissa. Liuoksesta otettiin näyte, joka laimennettiin vedellä 25-kertaiseksi. Tätä näytettä sekoitettiin vähintään puoli tuntia, jonka jälkeen tarkistettiin, että sen pH on halutuissa rajoissa.

Opinnäytetyön ohella tehtiin testejä 1 M suolahapon määrän vakioimiseksi. Tämän työn tarkoituksena oli testata, että löytyykö pH-säädössä käytettävän 1 M HCl:lle vakio määrä pesuliuoskonsentraatin valmistuksessa. Tämä työ tehtiin osana varsinaista opinnäytetyötä. 1 M suolahapon määrän vakiointi suoritettiin kolmella testillä, joista testit 1 ja 2 olivat samanlaisia. Kolmannessa testissä käytettiin sekoitusaikoja ja näytetilavuuksia testien 1 ja 2 perusteella.

Testeissä 1 ja 2 valmistettiin 5 litraa pesuliuoskonsentraattia testiä varten. Punnittavien aineiden määrät laskettiin ja punnittiin lopullisen näytetilavuuden mukaan. Ennen reagenssien lisäystä valmistusastiaan lisättiin vettä, jotta sekoituksen aikana lisättävät aineet sekoittuisivat paremmin. Punnittavat aineet lisättiin ohjeiden mukaisessa järjestyksessä liuokseen, jonka jälkeen vettä lisättiin pH:n säätöpainoon. Käytetty sekoitusnopeus oli 100 rpm.

Liuos jätettiin huoneenlämpöön sekoittumaan yön yli. Seuraavana päivänä huomattiin, että aineet eivät olleet lienneet. Liuoslaskuun muutettiin kerroin ja vettä lisättiin uuteen määrään. Tämän jälkeen aineet liukenivat veteen. Seuraavaksi otettiin ohjeiden mukaisesti kolme eri näytettä, joiden laimennus oli 25-kertainen. Jokaista näytettä sekoitettiin yhteensä 50 minuuttia, jonka aikana näytteiden pH:n muutosta seurattiin noin viiden minuutin välein.

Kunkin näytteen pH säädettiin 1 M HCl- liuoksella haluttuun arvoon. Näytteeseen 1 käytetyn 1 M HCl -määrä valittiin liuoksen laskuun, jolla laskettiin koko liuokseen lisättävä 1 M suolahapon määrä. 1 M HCl:n lisäyksen jälkeen vettä lisättiin loppupainoon.

Seuraavaksi otettiin kaksi eri näytettä kolmessa eri aikapisteessä: 15 min, 30 min ja 45 min. Jokaisesta laimennoksesta seurattiin pH:n muutosta 10 minuutin välein kuitenkin

vähintään 40 minuuttia. Huomattiin, että 15 minuuttia liuoksen sekoituksesta on liian riittämätön aika, kun taas 30 minuuttia sekoituksesta liuoksen pH on asettunut haluttuun pH:n rajoille.

Testissä 3 osoitettiin, että pesuliuoskonsentraatille on laskettavissa 1M HCl:n määrä.

Testien jälkeen laadittiin raportti, jossa kuvailtiin lyhyesti testien vaiheet, käytetyt sekoitusnopeudet ja -ajat ja saadut tulokset.



## 10 TULOKSET JA TARKASTELU

Sameustestissä otetut näytteet annosteltiin läpinäkyviin tasapohjaisiin lasipurkkeihin. Näytteiden kirkkautta eli sameusastetta vertailtiin veteen ja referenssiliuoksiin I-IV tummaa taustaa vasten kirkkaassa valossa. Sameustestistä saadut tulokset on ilmoitettu alla olevassa taulukossa 1. Taulukossa 1 on ensimmäiseen sarakkeeseen kirjattu sekoitus-aikoja säätöpainoon lisäykseen jälkeen. Toisessa sarakkeessa on kirjattu ovatko reagenssit lienneet tietyinä sekoitusaikana. Kolmannessa ja neljännessä sarakkeessa on kirjattu ovatko liuoksen pintanäytteet lienneet ja niiden sameusaste. Vastaavasti sarakkeet 5 ja 6 ovat liuoksen keskinäytteiden ja sarakkeet 7 ja 8 ovat liuoksen pohjanäytteiden tuloksille.

Taulukko 1. Sameustestin tulokset. Sekoitusaika säätöpainoon lisäyksen jälkeen.

Sekoitus aika säätöpainoon lisäyksen jäl- keen (min)	Reagenssit lienneet (kyllä/ei)	Standardi pinta (kyllä/ei)	Sameusaste (CLRW, Ref I-IV)	Standardi keski (kyllä/ei)	Sameusaste (CLRW, Ref I-IV)	Standardi pohja (kyllä/ei)	Sameusaste (CLRW, Ref I-IV)
100	ei	-	-	-	-	-	-
120	ei	-	-	-	-	-	-
150	kyllä	kyllä	Ref I	kyllä	Ref I	kyllä	Ref I
180	kyllä	kyllä	CLRW	kyllä	CLRW	kyllä	CLRW
210	kyllä	kyllä	CLRW	kyllä	CLRW	kyllä	CLRW

Taulukosta 1 huomataan, että reagenssit ovat lienneet veteen 150 minuutin kuluttua sekoituksen aloittamisesta, ja että näytteiden kirkkaus on sama kuin Ref I. Eli reagenssit ovat lienneet tasaisesti joka puolella liuosta.

Refraktometrissä otetut näytteet annosteltiin myös lasipurkkeihin. Näytteet mitattiin yksi kerrallaan Turun ammattikorkeakoulusta lainatulla refraktometrilaitteella. Jokaisesta näytteestä pipetoitiin pieni pisara laitteen linssiin, jonka jälkeen laite suljettiin. Laitteen mikroskoopin avulla säädettiin oikea mittausalue. Refraktometristä saadut tulokset on ilmoitettu alla olevassa taulukossa 2. Taulukossa 2 on kirjattu ensimmäiseen sarakkeeseen sekoitusaikoja säätöpainoon lisäykseen jälkeen. Toisessa sarakkeessa on kirjattu

ovatko reagenssit lienneet tietyinä sekoitusaikana. Sarakkeissa 3, 4 ja 5 on kirjattu pinnanäytteistä saatuja tuloksia: Brix-arvo, taitekerroin ja lämpötila. Vastaavasti sarakkeet 6, 7 ja 8 ovat keskinäytteiden ja sarakkeet 9, 10 ja 11 pohjanäytteiden tuloksille.

Taulukko 2. Refraktometrin tulokset. Sekoitusaika säätöpainoon lisäyksen jälkeen.

Sekoitusaika säätöpainoon lisäyksen jälkeen (min)	Reagenssit lienneet (kyllä/ei)	Standardi pinta (0...32% Bx)	Standardi pinta (taitekerroin)	Standardi pinta (°C)	Standardi keski (0...32 %Bx)	Standardi keski (taitekerroin)	Standardi keski (°C)	Standardi pohja (0...32 %Bx)	Standardi pohja (taitekerroin)	Standardi pohja (°C)
100	ei	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	ei	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	kyllä	28,5	1,378	24,3	28,5	1,378	24,2	28,5	1,378	24,2
180	kyllä	28,5	1,378	25,3	28,5	1,378	25,2	28,5	1,378	25,0
210	kyllä	28,5	1,378	25,6	28,5	1,378	25,1	28,5	1,378	25,0

Taulukossa 2 on homogeenisuustestissä saatuja refraktometrin tuloksia. Brix-arvo kertoo liuoksen kuiva-aineen määrän. Saatujen tulosten mukaan kuiva-aineen määrä oli jokaisessa näytteessä 28,5 %. Tämä lukema kertoo, että kaikki kuiva-aineet ovat lienneet. Pesuliuoskonsentraatin reagenssit ovat poolisia, kuten vesi, jonka taitekerroin on 1,33. Natriumkloridin taitekerroin on 1,5442. Liuoksessa olevien muiden aineiden taitekertoimia ei ole ilmoitettu kirjallisuudessa. Testissä otettujen näytteiden taitekerroin oli sama 1,378. Tähän taitekertoimen suuruuteen vaikuttaa luultavasti NaCl, jonka määrä on noin 10-kertainen verrattuna muihin reagensseihin. Sameustesti osoittautui testin perusteella tarkimmaksi, koska saatujen tulosten perusteella (taulukko 1) 150 minuutin sekoitusajan näytteet olivat sameampia kuin 180 minuutin sekoitusajan näytteet.

Valmistettavan pesuliuoskonsentraatin pH mitataan lopputilavuudesta. Näytteitä otetaan eri sekoitusaikoina siten, että laimennettavaa konsentraattia mitataan 40 ml. Jokaista näytettä sekoitetaan tämän jälkeen vähintään puoli tuntia ennen pH:n mittausta. Lopputilavuudesta saadut pH:n tulokset on ilmoitettu alla olevassa taulukossa 3.

Taulukko 3. pH:n mittaus lopputilavuudesta. Sekoitusaika lopputilavuuden jälkeen ennen näytteenottoa.

Näyte (40 ml konsentraatti + 960 ml CLRW-vesi)	Sekoitusaika lopputilavuuden jälkeen ennen näytteenottoa (min)	Laimennoksen sekoitusaika (väh. 30 min)	Mitattu pH	pH rajoissa $7.75 \pm 0.20$ (x/-)
1.	30	30	7.72	x
2.	45	30	7.85	x
3.	60	30	7.85	x
4.	75	30	7.84	x
5.	90	30	7.84	x

Taulukosta 3 huomataan, että pH pysyy halutuissa rajoissa ja tasoittuu 45 minuutin kuluessa sekoituksen aloituksesta. Tämän perusteella valitaan pH:n säädön ja lopputilavuuden lisäyksen jälkeen sekoitusajaksi vähintään 45 minuuttia ennen pH:n mittausta.

Ennen työn validointiosuutta huomattiin, että laskuissa oli tapahtunut virhe, minkä vuoksi 25x pesuliuoskonsentraatin sijasta oltiin valmistettu 22x pesuliuoskonsentraattia. Virhe tapahtui siinä, kun veden määrä laskettiin uudelleen muuttamalla laskukaavan kerrointa (kts. luku 9). Tämän vuoksi veden määrä kasvoi, mutta reagenssien määrä pysyi samana. Virhe olisi havaittu aikaisemmin, jos reagensseille olisi laskettu uudet määrät ja sen johdosta huomattu, että 25x pesuliuoskonsentraatti on liian kylläinen. Virheestä huolimatta työssä osoitettiin, että 22x ja sitä laimeammat pesuliuoskonsentraatit ovat liukoisia ja tasalaatuisia. Tämän huomion seurauksena pesuliuoskonsentraatti kasvatettiin 10-kertaisesta 20-kertaiseksi. 20x pesuliuoskonsentraatin valmistuksessa huomattiin, että kaikki reagenssit liukenivat veteen. Kuitenkin ajanpuutteen seurauksena 20x pesuliuoskonsentraatin lopputestejä ei voitu jatkaa, jonka vuoksi sitä ei käydä läpi tämän tarkemmin opinnäytetyössä.

## 11 LOPPUPÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli kasvattaa 10x pesuliuoskonsentraatin laimennuskerroin 25x pesuliuoskonsentraatiksi. Syy muutokseen oli kasvava tarve pesuliuokselle kuoppa-levykaivojen pinnoituksen prosesseissa. Määrän kasvattamisen sijaan oli tehokkaampaa valmistaa pesuliuoskonsentraattia, jonka valmistusaika on sama, mutta saanto on liuotettuna 2,5-kertainen nykyiseen verrattuna. Työn tarkoituksena oli osoittaa, että väkevämpi pesuliuoskonsentraatti on liukoinen ja tasalaatuinen. Konsentraatin homogeenisuutta testattiin ottamalla näytteitä sekoituksen eri aikapisteistä liuoksen pinnasta, keskeltä ja pohjasta. Testit suoritettiin visuaalisilla menetelmillä: sameustestillä ja refraktometrialla.

Homogeenisuustestien jälkeen oli tarkoitus suorittaa prosessivalidointi, jolla olisi todistettu, että menetelmä tuottaa toistettavasti halutunlaisen tuotteen. Prosessivalidoinnissa työ toistettaisiin kolme kertaa. Jokaisella kerralla valmistettaisiin 100 litraa pesuliuoskonsentraattia siten, että validointierille käytettäisiin niitä sekoitusnopeuksia ja -aikoja ja testimenetelmiä, jotka todettiin testierille parhaiksi. Prosessivalidoinnissa valittaisiin jokaiselle validointierälle omat henkilöt, jotka valmistaisivat pesuliuoskonsentraatin, mutta validoinnin testien tekeminen jäisi validoinnin suorittajalle. Prosessivalidoinnin kirjalliset osuudet ovat validointisuunnitelma ja -raportti.

Työssä tapahtuneen laskuvirheen vuoksi 25x pesuliuoskonsentraatin sijasta oli valmistettu 22x pesuliuoskonsentraatti. Ajanpuutteen vuoksi testejä ei voitu jatkaa pitemmälle 20x pesuliuoskonsentraatilla, joka osoittautui liukoiseksi. Työssä osoitettiin myös, että 25x pesuliuoskonsentraatti ei ollut liukoinen, koska yksi tai useampi reagenssi ei liennut veteen.

Liukenemattoman reagenssin tai reagenssien selvittämiseen voisi tehdä oman testinsä. Testi voisi olla seuraavanlainen: jokaisesta reagenssista tehtäisiin oma testiliuos siten, että jokaista reagenssia liuotetaan veteen 25-kertaisesti omiin astioihin. Testissä seurattaisiin reagenssien liukenemista veteen tietyn ajan kuluessa ja vertailtaisiin näiden liukenemisen nopeutta toisiinsa. Jos jokin reagensseista liukenisi hitaammin kuin toiset, voitaisiin olettaa, että tämä samainen reagenssi jää liukenematta pesuliuoskonsentraatissa. Jos taas kaikki reagenssit liukenevat yhtä hyvin tai nopeasti veteen, voidaan toteuttaa toisenlainen testi. Tässä testissä valmistettaisiin 25x pesuliuoskonsentraatti tavallisesti ohjeen mukaan siten, että jokaista reagenssia lisättäisiin yksi kerrallaan veteen niin, että

edellinen reagenssi on kokonaan liuennut. Tällä tavalla huomattaisiin mikä reagensseista ei enää liukene veteen. Tähän testiin menisi myös huomattavasti enemmän aikaa kuin edellisessä.

Voidaan myös laskennallisesti selvittää kunkin reagenssin liukeneminen veteen. Luvussa 4 on kerrottu käytettävien reagenssien liukoisuudet veteen.

Tris: 800 g/L

NaCl: 358 g/L

Germall II: 50 g/L

Tween 20: 1000 g/L.

Huomataan, että Germall II on niukkaliukoisin ja Tween 20 liukoisin kaikista reagensseista. Lasketaan seuraavaksi veden määrän ja reagenssien liukoisuuden avulla, kuinka paljon kutakin reagenssia liukenee maksimissaan veteen. Oletetaan veden määräksi 50 litraa.

$$\text{Tris: } 800 \text{ g/L} * 50 \text{ L} = 40\,000 \text{ g}$$

$$\text{NaCl: } 358 \text{ g/L} * 50 \text{ L} = 17\,900 \text{ g}$$

$$\text{Germall II: } 50 \text{ g/L} * 50 \text{ L} = 2\,500 \text{ g}$$

$$\text{Tween 20: } 1000 \text{ g/L} * 50 \text{ L} = 50\,000 \text{ g}.$$

Lasketuista määristä huomataan, että Tris ja Tween 20 liukenevat parhaiten veteen. (Punnittu määrä on paljon pienempi kuin maksimimäärä.) Huomataan myös, että Germall II ja NaCl punnitut määrät ovat lähellä maksimimäärää. Saattaa siis olla, että Germall II sekä NaCl on jäänyt liukenematta määrien vuoksi veteen, mutta toisaalta NaCl liukenee paremmin veteen kuin Germall II. Liukenematon aine voi näin ollen olla Germall II. Kuitenkin teoreettiset laskut eivät välttämättä vastaa todellisuutta, jolloin liukenemattoman aineen selvittämiseksi on parempi tehdä konkreettinen koe.

## LÄHTEET

Agitators, D., 2015. *Dynamix Agitators*. [Online]  
Available at: <http://www.dynamixinc.com/optimal-tank-design>  
[Haettu 12 3 2018].

Contact Dermatitis Institute, 2018. *diazolidinyl urea (germall ii)*. [Online]  
Available at: <http://www.contactdermatitisinstitute.com/diazolidinyl-urea-germall-ii.php>  
[Haettu 14 3 2018].

Davis, Ryan Z., 2010. *Design and scale-up of production scale stirred tank fermentors*. [Online]  
Available at: <https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1533&context=etd>  
[Haettu 14 3 2018].

Eskeli, H. ym., ei pvm *Laboratorioanalyysit*. [Online]  
Available at: [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_6-2\\_potentiometria.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_6-2_potentiometria.html)  
[Haettu 14 3 2018].

FDA, 2011. *Guidance for industry, Process validation: general principles and practices*. [Online]  
Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070336.pdf>  
[Haettu 14 3 2018].

Grainger, W., 2016. *How to use a hydrometer*. [Online]  
Available at: <https://www.grainger.com/content/supplylink-how-to-use-hydrometer>  
[Haettu 14 3 2018].

Jaakkola, E., 2009. *Automaattisen pH- ja johtolukumittauslaitteiston käyttöönotto ja validointi*. [Online]  
Available at: [http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/5554/Jaakkola\\_Elina.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/5554/Jaakkola_Elina.pdf?sequence=1&isAllowed=y)  
[Haettu 14 3 2018].

Kalsi, L., 2015. *Reaktiot ja tasapaino. Liukoisuus*. s.l.:Otavan opisto.

Kankainen, M., 2014. *Paakkujen lietto. Sekoituksen tutkiminen.* [Online] Available at:

[http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/71906/Kankainen\\_Minna.PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/71906/Kankainen_Minna.PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[Haettu 14 3 2018].

Karjalahti, K., 1987. *Yleinen Prosessiteknikka 1. Mekaaniset prosessit.* Helsinki: Ammattikasvatuskeskushallitus valtion painatuskeskus .

Korhonen, H. & Vesterinen, V.-M., 2016. *Kemian perusharjoitustyöt II.* Turku: Turun Yliopisto, Kemian laitos.

Lehtonen, P. & Sihvonen, M.-L., 2004. *Laboratorioalan analyttinen kemia.* Helsinki: Opetushallitus.

Leonard, D. J. E., 2015. *Tris Buffers- What electrodes can I use?.* [Online] Available at: <https://www.broadleyjames.com/faq/tris-buffers-what-electrodes-can-i-use/> [Haettu 14 3 2018].

Merck, 2009. *Safety data sheet NaCl.* [Online] Available at: [http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-FI-Site/en\\_US/-/EUR/ProcessMSDS-Start?PlainSKU=MDA\\_CHEM-106404&ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.fi%2F](http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-FI-Site/en_US/-/EUR/ProcessMSDS-Start?PlainSKU=MDA_CHEM-106404&ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.fi%2F)

[Haettu 14 3 2018].

Merck, 2015. *Käyttöturvallisuustiedote, Tris.* s.l.:s.n.

Mäntyvaara, T., 2011. *Refraktometrin prisman likaantuminen.* [Online] Available at:

<https://aaltodoc.aalto.fi/bitstream/handle/123456789/3785/urn100541.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

[Haettu 14 3 2018].

Paul Schindler, R. A. R. R. G. B., 1967. *Solubility of Tris(hydroxymethyl)aminomethane in water-methanol solvent mixtures and medium effects in the dissociation of the protonated base.* [Online]

Available at: [https://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/jres/72A/jresv72An2p141\\_A1b.pdf](https://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/jres/72A/jresv72An2p141_A1b.pdf)

[Haettu 14 3 2018].

Sigma-Aldrich, ei pvm *Product Information, Tween 20*. [Online]  
Available at:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2287?lang=fi&region=FI>  
[Haettu 14 3 2018].

Terho, ei pvm *Sameustesti. European Pharmacopoeia 5.0. Clarity and degree of opalescence of liquids, visual method*, s.l.: s.n.

Zeus Tech Oy, 2013. *Zeus Tech*. [Online]  
Available at: <http://www.zeus.fi/validointi.html>  
[Haettu 14 3 2018].